

REC'D 15 NOV 2000

PCT/JP00/05659

WIPO PCT

20.09.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09/830111

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 8月24日

EKV

願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第237561号

願 人
Applicant(s):

鐘淵化学工業株式会社

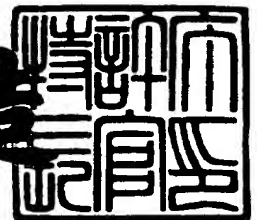
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月27日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3087534

【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-3961

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09
C12N 1/21
C12N 9/12

【発明者】

【住所又は居所】 島根県松江市西持田町 3 6 2 - 6 6

【氏名】 松田 英幸

【発明者】

【住所又は居所】 島根県松江市西川津町 3 0 8 1 - 1 1

【氏名】 川向 誠

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県明石市小久保 1 2 0 - 5 5 - A 8 0 4

【氏名】 矢島 麗嘉

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区井吹台東町 5 - 2 1 - 3

【氏名】 池中 康裕

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県明石市大久保町高丘 2 - 1 3 - 4

【氏名】 長谷川 淳三

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区神和台 1 - 1 3 - 1 3

【氏名】 高橋 里美

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代表者】 武田 正利

【代理人】

【識別番号】 100086586

【弁理士】

【氏名又は名称】 安富 康男

【選任した代理人】

【識別番号】 100104813

【弁理士】

【氏名又は名称】 古谷 信也

【選任した代理人】

【識別番号】 100108431

【弁理士】

【氏名又は名称】 村上 加奈子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 033891

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705256

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 コエンザイム Q_{10} の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 に記載の DNA 配列、又はこの配列において 1 若しくは複数の塩基が欠失、追加、挿入、置換された DNA 配列を有し、デカプレニル 2 磷酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 2】 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列、又はこの配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、追加、挿入、置換されたアミノ酸配列を有し、デカプレニル 2 磷酸合成酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 3】 請求項 2 記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 4】 発現用ベクターに請求項 1 又は 3 記載の DNA を組み込んでなる発現ベクター。

【請求項 5】 発現用ベクターは、pUCNT である請求項 4 記載の発現ベクター。

【請求項 6】 発現ベクターは、pNTSal である請求項 5 記載の発現ベクター。

【請求項 7】 宿主微生物を請求項 1 又は 3 記載の DNA にて形質転換してなる形質転換体。

【請求項 8】 宿主微生物を請求項 4、5 又は 6 記載の発現ベクターにて形質転換してなる形質転換体。

【請求項 9】 宿主微生物は、Escherichia coli である請求項 7 又は 8 記載の形質転換体。

【請求項 10】 Escherichia coli は、Escherichia coli DH5 α である請求項 9 記載の形質転換体。

【請求項 11】 形質転換体は、E. coli DH5 α (pNT Sal) (FRPM BP-6844) である請求項 10 記載の形質転換体。

【請求項 12】 請求項 7、8、9、10 又は 11 記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物中にコエンザイム Q_{10} を生成蓄積し、これを採取する工程からなるコエンザイム Q_{10} の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、医薬品等として用いられているコエンザイム Q_{10} の製造に関する。さらに詳細には、コエンザイム Q_{10} の生合成に関するキー酵素であるコエンザイム Q_{10} 側鎖合成酵素、すなわちデカプレニル 2 磷酸合成酵素をコードする遺伝子を *Saitoella* 属に属する真菌より単離し、これを微生物に導入することによりコエンザイム Q_{10} を生成させる方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来のコエンザイム Q_{10} の製造法は、タバコなどの植物由来のコエンザイムを単離してその側鎖長を合成法により調整する等によって工業的には生産されている。

また、コエンザイム Q_{10} は細菌や酵母などの微生物から高等動植物に至るきわめて幅広い生物により生産されることが知られているが、微生物を培養してその菌体より本物質を抽出する方法が最も有効な一つの製造法であると考えられ、実際の工業的な生産にも用いられている。しかしながら、これらの方法では、生成量が少なかったり、操作が煩雑であったりして、生産性が良くなかった。

【0003】

コエンザイム Q_{10} の生物による生合成経路については、原核生物と真核生物では一部異なっているが、いずれも多く酵素が関与した多段階の複雑な反応によって生成されている。しかし、基本的には大きく3つのステップ、すなわち、コエンザイム Q_{10} のプレニル側鎖のもとになるデカプレニル 2 磷酸を合成するステップ、キノン環のもとになるパラヒドロキシ安息香酸を合成するステップ、そして、これらの2つの化合物を結合させて置換基を順次変換してコエンザイム Q_{10} を完成させるステップよりなっている。これらの反応の中で、生合成反応全体の律速であると言われ、コエンザイム Q_{10} の側鎖の長さを決定している反応、すなわちデカプレニル 2 磷酸合成酵素の反応は最も重要な反応であると考えられる。そこで、コエンザイム Q_{10} を効率よく生産させる為には、生合成に関与するキー遺

伝子、デカプレニル 2 磷酸合成酵素の遺伝子を単離して生産増強に利用することが有効であると考えられるが、その遺伝子源としてはコエンザイム Q_{10} を比較的多量に生産している真菌類が有力な候補となる。

【0004】

これまでにデカプレニル 2 磷酸合成酵素の遺伝子としては、*Schizosaccharomyces pombe* (特開平 9-173076) や *Glucanobacter suboxydans* (特開平 10-57072) などいくつかの種類の微生物より分離されているが、本来これらの微生物ではコエンザイム Q_{10} の生産性が十分とはいえず、これらの微生物では効率的な培養や分離精製などは出来ていなかった。そこで、さらにコエンザイム Q_{10} を高生産する微生物由来の本酵素遺伝子を単離することが望まれていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記の生産に関する問題を解決するべく、*Saitoella* 属に属する真菌由来のコエンザイム Q_{10} の側鎖合成遺伝子を単離してこれを利用することにより、微生物によってコエンザイム Q_{10} を効率よく生産することを目的とする。

上記目的を達成する為に、本発明では、まず、*Saitoella* 属に属する真菌よりコエンザイム Q_{10} の生合成に関与するキー遺伝子、デカプレニル 2 磷酸合成酵素の遺伝子を単離した。そして、該遺伝子を大腸菌などの微生物に導入して発現させることにより、コエンザイム Q_{10} を効率よく生産させることが可能となった。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、コエンザイム Q_{10} を比較的多量に生産している *Saitoella* 属に属する真菌からデカプレニル 2 磷酸合成酵素遺伝子を分離するための検討を重ね、該遺伝子を分離することに成功した。

【0007】

即ち本発明は、配列番号 1 に記載の DNA 配列、又はこの配列において 1 若しく

は複数の塩基が欠失、追加、挿入、置換されたDNA配列を有し、デカプレニル 2 磷酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを提供する。本発明はまた、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列、又はこの配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、追加、挿入、置換されたアミノ酸配列を有し、デカプレニル 2 磷酸合成酵素活性を有するタンパク質、さらにこのタンパク質をコードするDNAを提供する。

【0008】

さらに本発明は、上記DNAを含有する発現ベクターを提供する。本発明の発現ベクターは、従来知られているベクター系いずれを用いても良く、例えば発現用ベクター pUCNT へ配列番号 1 の配列を有するDNAを導入してなる、pNT Sa1 が提供される。

本発明は、宿主微生物を上記DNAにて形質転換してなる形質転換体もまた、提供する。本発明の宿主微生物としては、Escherichia coli が好適に用いられる。

【0009】

本発明はさらに、上記形質転換体を培地中で培養し、培養物中にコエンザイム Q₁₀ を生成蓄積し、これを採取する工程からなるコエンザイム Q₁₀ の製造方法を提供する。本発明の方法において用いる、宿主微生物としては特に限定されないが、Escherichia coli が好適に用いられる。Escherichia coli の産生するコエンザイム Q は、コエンザイム Q₈ であるが、本発明の方法によって、コエンザイム Q₁₀ を産生させることが可能となった。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明者らは、コエンザイム Q₁₀ を比較的多量に生産している Saitoella 属に属する真菌から本酵素遺伝子を分離するための検討を重ねたところ、PCR 法によって該遺伝子の断片を取得することに成功した。

【0011】

既知のデカプレニル 2 磷酸合成酵素、及び本酵素と類縁で鎖長の違うコエンザイム Q の長鎖プレニル鎖合成酵素であるポリプレニル 2 磷酸合成酵素の遺伝子の配

列を比較し、その相同性の高い領域についてPCRプライマーを各種合成した。そしてこれらのプライマーを種々組み合わせ、PCRの条件をいろいろ検討したところ、プライマーDPS-1 (5' -AAGGATCCTNYTNCAYGAYGAYGT-3') 及びDPS-1 1AS (5' -ARYTGNADRAAYTCNCC-3') を用い (なお、ここで示した配列中の、RはAまたはG、YはCまたはT、そしてNはG、A、TまたはCを示す。)、PCRを94℃、3分間の熱処理の後、94℃、1分→43℃、2分→72℃、2分のサイクルを40回繰り返すことにより、*Saitoella* 属に属する真菌、*Saitoella complicata* IFO 10748の染色体遺伝子から本酵素遺伝子の約220bpの断片が増幅してくることを、その遺伝子の塩基配列を解析することにより明らかにした。

【0012】

そこで次に本酵素遺伝子の全長を取得するためには、*Saitoella complicata* IFO 10748の染色体遺伝子を制限酵素EcoRIで切断し、ラムダファージベクターに挿入して組換えファージライブラリーを作製する。そのブランクをナイロン膜に転写した後、標識した該PCR断片を用いてブランクハイブリダイゼーションを行えば、デカプレニル2 燐酸合成酵素遺伝子全長を持つクローンを取得することができる。

【0013】

得られたクローンに含まれるデカプレニル2 燐酸合成酵素遺伝子について塩基配列の決定を行ったところ、配列表の配列番号1に示した配列を持つことが明らかとなり、この配列から予想できるアミノ酸配列にはデカプレニル2 燐酸合成酵素の遺伝子として特徴的な配列がみられる。

【0014】

本発明において、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列は、配列番号1に示すDNA配列から予測されるアミノ酸配列である。配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質には、デカプレニル2 燐酸合成酵素活性を有するものが含まれる。コドンは縮重しているため、配列番号2に示すアミノ酸配列から予測されるDNA配列としては、配列番号1を含んで複数挙げられ、これら

の配列を有するDNAにはデカプレニル2 燐酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするものが含まれる。

【0015】

本発明において、デカプレニル2 燐酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAには、配列番号1 及び配列番号2 に示すアミノ酸配列から予測されるDNA 配列を有するものに限らず、発現して得られたタンパク質がデカプレニル2 燐酸合成酵素活性を有する限り、これらのDNA 配列において1 若しくは複数の塩基が欠失、追加、挿入、置換されたDNA 配列を有するDNA も含まれる。

本発明において、デカプレニル2 燐酸合成酵素活性を有するタンパク質には、配列番号2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に限らず、デカプレニル2 燐酸合成酵素活性を有する限り、この配列において1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、追加、挿入、置換されたアミノ酸配列を有し、デカプレニル2 燐酸合成酵素活性を有するタンパク質も含まれる。

【0016】

デカプレニル2 燐酸合成酵素遺伝子を発現させるためには、適当なプロモーターの下流に該遺伝子を接続することが必要であるが、例えば遺伝子を含むDNA 断片を制限酵素によって切り出したり、PCR によって酵素をコードする遺伝子部分のみを増幅させたりした後、プロモーターを持つベクターに挿入することにより発現ベクターとすることができる。本発明において、デカプレニル2 燐酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA を組み込む発現用ベクターとしては特に限定されず、例えば、大腸菌由来のプラスミドに、適当なプロモーターを組み込んだものが挙げられる。大腸菌由来のプラスミドとしては、例えば、pBR322、pBR325、pUC19、pUC119 等が挙げられ、プロモーターとしては、例えば、T7プロモーター、trpプロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター、λPLプロモーター等が挙げられる。また、本発明においては発現用ベクターとして、pGEX-2T、pGEX-3T、pGEX-3X（以上、ファルマシア社製）、pBluescriptII、pUC19（東洋紡社製）、pMALC2、pET-3T、pUCNT（WO94/03613 に記載）等を用いることもできる。このうち、pUCNT が好適に用いられ

、具体的な例としては、発現用ベクター pUCNT に配列番号 1 に示す DNA 配列を有する遺伝子を挿入すれば、デカプレニル 2 磷酸合成酵素遺伝子の発現ベクター、pNTSa1 を作製することができる。

【0017】

そして、該酵素遺伝子の発現ベクターを適当な微生物に導入することによりコエンザイム Q₁₀ の生産に利用することが可能となる。宿主微生物としては特に限定されず、Escherichia coli が好適に用いられる。Escherichia coli としては特に限定されず、XL1-Blue、BL-21、JM109、NM522、DH5 α 、HB101、DH5 等が挙げられる。このうち Escherichia coli DH5 α が好適に用いられ、例えば、デカプレニル 2 磷酸合成酵素遺伝子の発現ベクター、pNTSa1 を大腸菌に導入した場合には、大腸菌が本来は生産しないコエンザイム Q₁₀ を、著量生産するように変換できる。この大腸菌菌株 E. coli DH5 α (pNTSa1) は通商産業省、工業技術院、生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に FERM BP-6844 として寄託されている。

【0018】

また、宿主微生物として川向らが作製したオクタプレニル 2 リン酸合成酵素遺伝子破壊大腸菌菌株 Escherichia coli KO229 (Journal of Bacteriology、1997 年、第 179 巻、3058-3060 頁) はコエンザイム Q₈ が生産できないため、これを宿主として用いることによりさらにコエンザイム Q₁₀ を高生産する事ができる。

本遺伝子は単独で用いるほか、他の生合成に関与する遺伝子と同時に微生物に導入して発現させることにより、さらに良い効果が期待できる。

【0019】

本発明で得られた形質転換体を、常法に従い、培養し、培養物中からコエンザイム Q₁₀ を採取することにより、コエンザイム Q₁₀ を製造することができる。宿主微生物が Escherichia coli である場合は、培地として、LB 培地や、グルコースやカザミノ酸を含む M9 培地を用いることができる。プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、イソプロピルチオガラクトシドやイン

ドリル-3-アクリル酸のような薬剤を培地に加えてもよい。培養は例えば、37℃で17～24時間行い、この際必要により通気や攪拌を行ってもよい。本発明において、得られたコエンザイムQ₁₀は精製を行ってもよく、粗精製物として用いてもよく、用途により適宜選択することができる。得られた培養物からコエンザイムQ₁₀を単離するには公知の分離・精製法を適宜組み合わせることができる。公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈殿等の溶解度を利用する方法、透析法、限外濾過法、ゲル濾過法、及び、(SDS-)ポリアクリルアミドゲル電気泳動法等の主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を利用する方法等が挙げられる。本発明において得られたコエンザイムQ₁₀の用途は特に限定されず、医薬品等に好適に用いることができる。

【0020】

【実施例】

(実施例1)

Saitoella complicata IFO 10748の染色体DNAをC. S. Hoffmanらの方法(Gene, 57(1987)267-272)で調製した。既知の長鎖プレニル2リン酸合成酵素の遺伝子との相同性からPCRに用いるプライマーDPS-1(5'-AAGGATCCTNYTNCAYGAYGAYGT-3')及びDPS-1 1AS(5'-ARYTGNADR AAYTCNCC-3')を設計した。なお、ここで示した配列中の、RはAまたはG、YはCまたはT、そしてNはG、A、TまたはCを示す。これらを用いてPCRを94℃、3分間の熱処理の後、94℃、1分→43℃、2分→72℃、2分のサイクルを40回繰り返すことにより行い、1.2%アガロースゲル電気泳動により分析した。

【0021】

そして得られた約220bpの断片をゲルより切り出してDNA抽出キット(Sephaglas(商標) Brand Prep Kit、アマシャムファルマ

シアバイオテック社製)を用いて精製した後、PCR産物ダイレクトクローニングキット(pT7BlueT-Vector Kit、NOVAGEN社製)を用いて大腸菌発現用ベクターにクローニングし、pT7-SaDPSを得た。DNA塩基配列をDNAシーケンサー(377型、パーキンエルマー社製)を用い、DNAシーケンスキット(パーキンエルマー社製、ABI PRISM(商標) BigDye(商標) Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit With AmptiTaq(登録商標) DNA polymerase、FS)を使用して、その取り扱い説明書に従って反応を行い配列を決定した。その結果、配列表の配列番号1の717から924までの塩基配列に示す配列が得られた。この翻訳配列に長鎖プレニル鎖を持つプレニル2 燐酸合成酵素に特徴的な領域の配列「GDFLLGRA」が見出せたことにより、得られた配列はデカプレニル2 燐酸合成酵素の遺伝子の一部であることが想定された。

【0022】

(実施例2)

Saitoella complicata IFO 10748のデカプレニル2 燐酸合成酵素遺伝子と思われる220bpのDNA断片を持つpT7-SaDPSベクター-DNA 0.03 μ gを用い、PCR用のプライマーSa-1S(5'-GAGACCAGACGAAACGCACCA-3'の配列を持つ)及びSa-2AS(5'-TGGTGCGTTTCGTCTGGTCTC-3'の配列を持つ)を用いてPCR(94℃、3分→(94℃、30秒→55℃、30秒→72℃、1分)×25サイクル繰返し→72℃、5分→4℃)を行い、1.2%アガロース(宝酒造製)によるゲル電気泳動を行い、約145bpの断片をゲルより切り出してDNA抽出キット(Sephaglas(商標) Brand Prep Kit、アマシャムファルマシアバイオテック社製)を用いて精製した。このDNA断片約100ngを用い、ECLダイレクト核酸ラベリングシステム(アマシャムファルマシアバイオテック社製)を用いて化学発光標識した。

【0023】

(実施例3)

Saitoella complicata IFO 10748の染色体DNAを制限酵素EcoRIで切断し、0.8%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った。このゲルをアルカリ(0.5M NaOH、1.5M NaCl)で変成させ、中和(0.5M Tris·HCl (pH7.5)、1.5M NaCl)した後、ハイボンドN+フィルター(アマシャム社製)をゲルに重ね、20×SSCを用いて一晩、サザントランスファーさせた。そのフィルターを乾燥し、80℃で2時間焼付けを行った後、ECLダイレクト核酸ラベリング・検出システム(アマシャムファルマシアバイオテク社製)でサザンハイブリダイゼーションと検出を行った。すなわち、ゴールドハイブリダイゼーション液(アマシャムファルマシアバイオテク社製)を用いて42℃、1時間プレハイブリダイズした。

【0024】

化学発光標識したプローブを95℃で5分間加熱後、氷中で急冷し、プレハイブリダイズ処理したフィルターのプレハイブリダイズ液に添加し、42℃で22時間ハイブリダイズさせた。このフィルターを6M尿素、0.4%SDSを含む0.5×SSC溶液を用いて42℃で20分2回洗浄後、2×SSC溶液を用い室温で5分2回洗浄した。このフィルターをエンハンスドケミルネセンス試薬(アマシャムファルマシアバイオテク社製)に浸した後、X線フィルムに密着させて感光させ、黒く感光したバンドを検出した。

その結果、制限酵素EcoRIで切断した約10kbpの断片に強くハイブリダイズしていた。

【0025】

(実施例4)

Saitoella complicata IFO 10748の染色体DNAを制限酵素EcoRIで切断し、0.8%アガロースによるゲル電気泳動を行い、約10kbp付近のDNA断片をゲルより切り出して精製することにより、クローン化に用いるDNA断片を調製した。このDNA断片をλ-DASHIIファージキット(ストラテジーン社製)を用いてそのファージのEcoRIサイトに組み込み、インビトロパッケージングキット(アマシャム社製)でパッケージングを行った。そして、大腸菌XL1-Blue MRA(P2)に感染させてN

ZY平板培地 (5 g/L NaCl、2 g/L MgSO₄ · 7H₂O、5 g/L 酵母エキス、10 g/L NZアミン、18 g/L 寒天 (pH 7.5)) 上に NZY軟寒天培地 (NZY平板培地の寒天のみ 8 g/L) とともに重層してプラークとした。これをハイボンドN+フィルター (アマシャム社製) にトランスファーしアルカリ (0.5M NaOH、1.5M NaCl) で変成した後、中和 (0.5M Tris · HCl (pH 7.5)、1.5M NaCl)、乾燥し、80℃で2時間焼付けを行った。

【0026】

焼き付け後のフィルター9枚を用い、実施例3と同様にプレハイブリダイゼーション、化学発光標識したプローブを用いたハイブリダイゼーションを行い、このフィルターを洗浄した。このフィルターを乾燥後、X線フィルムに密着させて感光させ、黒く感光したスポットに対応するファージのプラークを分離した。この分離したプラークのファージを上記と同様の方法で大腸菌に感染させてプラークとし、フィルターに写して再びハイブリダイゼーションを行い、確認を行ったところ、6株のファージが選択できた。

【0027】

このファージの懸濁液を用い、上記の Sa-1 S 及び Sa-2 AS を用い PCR を行ったところ、6株に 145 bp の DNA 断片が検出できた。そこで組み換え λ-DASH II ファージ粒子からラボマニュアル遺伝子工学 (村松正實編、丸善株式会社、1990年) に従って、ファージDNAを調製した。調製したファージDNAを、サブクローニングするため、制限酵素 SaI I、SacI で切断し、0.8%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った。このゲルをアルカリ (0.5M NaOH、1.5M NaCl) で変成させ、中和 (0.5M Tris · HCl (pH 7.5)、1.5M NaCl) した後、ハイボンドN+フィルター (アマシャム社製) をゲルに重ね、20×SSCを用いて一晩、サザントランスファーさせた。そのフィルターを乾燥し、80℃で2時間焼付けを行った後、ECLダイレクト核酸ラベリング・検出システム (アマシャムファルマシアバイオテク社製) でサザンハイブリダイゼーションと検出を行った。すなわち、ゴールドハイブリダイゼーション液 (アマシャムファルマシアバイオテク社製)

を用いて42℃、1時間プレハイブリダイズした。

【0028】

化学発光標識したプローブを95℃で5分間加熱後、氷中で急冷し、プレハイブリダイズ処理したフィルターのプレハイブリダイズ液に添加し、42℃で22時間ハイブリダイズさせた。このフィルターを6M尿素、0.4% SDSを含む0.5×SSC溶液を用いて42℃で20分2回洗浄後、2×SSC溶液を用い室温で5分2回洗浄した。このフィルターをエンハンスドケミルネセンス試薬（アマシャムファルマシアバイオテック社製）に浸した後、X線フィルムに密着させて感光させ、黒く感光したバンドを検出した。

【0029】

その結果、制限酵素SalIで切断した約4.5kbとSacIで切断した約3.5kbの断片に強くハイブリダイズしていた。ファージDNAを、制限酵素SalI、SacIで切断し、0.8%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った。そして黒く感光したバンドに相当する位置の大きさの制限酵素消化断片をゲルより切り出してDNA抽出キット（Sephaglas（商標）BrandPrep Kit、アマシャムファルマシアバイオテック社製）を用いて精製した後、DNA塩基配列をDNAシーケンサー（377型、パーキンエルマー社製）を用い、DNAシーケンスキット（パーキンエルマー社製、ABI PRISM（商標）BigDye（商標）Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit With Ampti Taq（登録商標）DNA polymerase、FS）を使用して、その取り扱い説明書に従って反応を行い配列を決定した。

【0030】

その結果、配列表の配列番号1の1124にSalIサイトが、1241にSacIサイトが存在することが判り、C末端までを両断片とも含まなかったため、2つの制限酵素のうち、デカプレニル2 磷酸合成酵素遺伝子の中の前の方に存在しているSalIについて残りの制限断片を調べたところ3kbpの断片に、SacI断片の終わりの部分を含む終止コドンまでを含んでいた。これら3つの制限酵素断片を解析することによりデカプレニル2 磷酸合成酵素遺伝子の全配列を

明らかにすることができた。3つのDNA断片のうちの、約1.6 kbpのDNAについてその塩基配列を決定したが、その結果を配列表の配列番号1に示す。また、このDNA配列から予測されるアミノ酸配列を配列番号2に示した。

【0031】

得られた配列を、Journal of Biological Chemistry、1990年、第265巻、13157-13164頁に記載の*Saccharomyces cerevisiae*のデカプレニル2リン酸合成酵素遺伝子と比較したところ、アミノ酸配列では約48%の相同性を有していた。また、特開平9-173076に記載の*Schizosaccharomyces pombe*由来のデカプレニル2リン酸合成酵素と比較したところ、アミノ酸では49%の相同性を有していた。

【0032】

(実施例5)

調製したファージDNAよりデカプレニル2リン酸合成酵素をコードする遺伝子部分のみを切り出す為、合成DNAプライマーSa-N1 (5'-AACATATGGCCTCACCAAGCACTGCGG-3'の配列を持つ)及びSa-C (5'-AAGAATTCTCTATCTTGACCTAGTCAACAC-3'の配列を持つ)を用いて実施例3と同様にPCRを行い、制限酵素NdeI及びEcoRIで切断した後、発現用ベクターpUCNT (WO94/03613に記載)に挿入してデカプレニル2リン酸合成酵素遺伝子の発現ベクター、pNTSa1を作製した。得られた発現ベクター、pNTSa1の制限酵素地図を図1に示す。なお、DPSとは、デカプレニル2リン酸合成酵素遺伝子のコード領域を意味する。

【0033】

(実施例6)

作製したデカプレニル2リン酸合成酵素遺伝子の発現ベクターpNTSa1を大腸菌DH5αに導入し、10mLのLB培地で37℃、一晚振とう培養し、菌を遠心分離(3000回転、20分間)で集めた。

【0034】

この菌体を 1 mL の 3 % 硫酸水溶液に懸濁し、120℃、30 分間熱処理後、2 mL の 14 % 水酸化ナトリウム水溶液を添加して更に 120℃、15 分間熱処理した。この処理液に 3 mL のヘキサン・イソプロパノール (10 : 2) を添加して抽出し、遠心分離の後、その有機溶媒層 1.5 mL を分離し、減圧条件で溶媒を蒸発させて乾固した。これを 200 μ L のエタノールに溶解し、その 20 μ L を高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製、LC-10A) により分析した。分離には逆相カラム (YMC-pack ODS-A、250 \times 4.6 mm、S-5 μ m、120A) を使い、エタノール・メタノール (2 : 1) を移動相の溶媒として使用して分離させ、275 nm の波長の吸光度で生成したコエンザイム Q₁₀ を検出した。結果を図 2 に示した。図 2 に示すように、デカプレニル 2 磷酸合成酵素遺伝子を導入して発現させることによって、組換え大腸菌では、大腸菌が本来生産しないコエンザイム Q₁₀ を、生産するようになったことが分かった。

【0035】

得られた組換え大腸菌株 *E. coli* DH5 α (pNT Sa1) は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に平成 11 年 8 月 17 日に寄託した (受託番号 FERM BP-6844)。

【0036】

(実施例 7)

川向らが作製したオクタプレニル 2 リン酸合成酵素遺伝子破壊大腸菌菌株 *Escherichia coli* KO229 は、該遺伝子がスペクチノマイシン耐性プラスミド上 (pKA3) に保持された状態で維持され、該プラスミドが脱落すると致死になることが判っている (Journal of Bacteriology 1997 年、第 179 巻、3058-3060 頁)。この破壊株に pNT Sa1 を導入するため、KO229 に pNT Sa1 を導入後、アンピシリンを含む 10 mL の LB 培地で 37℃、一晩振とう培養し、その 1 % を新たなアンピシリンを含む 10 mL の LB 培地に継植後、さらに 37℃、一晩振とう培養する事を 9 回繰り返した後、アンピシリンを含む LB プレート培地で生育し、スペクチノマイシンを含む LB プレート培地で生育し無い株を選択した。

【0037】

(実施例 8)

実施例 7 で作製した pNTSa1 を導入した KO229 株を 10 mL の LB 培地で 37℃、一晚振とう培養し、菌を遠心分離 (3000 回転、20 分間) で集めた。

【0038】

この菌体を 1 mL の 3% 硫酸水溶液に懸濁し、120℃、30 分間熱処理後、2 mL の 14% 水酸化ナトリウム水溶液を添加して更に 120℃、15 分間熱処理した。この処理液に 3 mL のヘキサン・イソプロパノール (10:2) を添加して抽出し、遠心分離の後、その有機溶媒層 1.5 mL を分離し、減圧条件で溶媒を蒸発させて乾固した。これを 200 μ L のエタノールに溶解し、その 20 μ L を高速液体クロマトグラフィー (島津製作所製、LC-10A) により分析した。分離には逆相カラム (YMC-pack ODS-A、250 \times 4.6 mm、S-5 μ m、120A) を用い、エタノール・メタノール (2:1) を移動相の溶媒として使用して分離させ、275 nm の波長の吸光度で生成したコエンザイム Q₁₀ を検出した。結果を図 3 に示した。図 3 に示すように、デカプレニル 2 磷酸合成酵素遺伝子を導入して発現させることによって、大腸菌が本来生産しないコエンザイム Q₁₀ を、生産するようになり、また、コエンザイム Q₈ を生産できる大腸菌に比べてコエンザイム Q₁₀ を、著量生産するように変換できた。

【0039】

【発明の効果】

コエンザイム Q₁₀ の生合成に関するキー酵素、デカプレニル 2 磷酸合成酵素をコードする遺伝子を *Saitoella* 属の真菌より単離し、配列決定を行った。また、これを大腸菌に導入して発現させることに成功した。本発明の方法を用いることにより医薬品等として用いられているコエンザイム Q₁₀ を効率的に製造することができる。

【0040】

【配列表】

<110> Kanegabuchi Kagaku Kabushiki Kaisha

<120> Method for preparing Coenzyme Q₁₀

<130> TKS-3961

<160> 2

<210> 1

<211> 1653

<212> DNA

<213> Saioella complicata

<400> 1

ttttgtgggg tcgaaaagtc ggcacgggtg caggttcggc ttgagaccag taaaggctcg 60

gagattgagt tcaggacaaa gctttgatcc gtgaggtcta catcttcagc aaatcatttc 120

aaatccatat acc atg gcc tca cca gca ctg cgg ata cga agc atc agc 169

Met Ala Ser Pro Ala Leu Arg Ile Arg Ser Ile Ser

1

5

10

tct cga tca atc gcc tct ctg cga tcg gtt acc cta aga aca gcc tcg 217

Ser Arg Ser Ile Ala Ser Leu Arg Ser Val Thr Leu Arg Thr Ala Ser

15

20

25

gca cct tca tta cga cta aga tgt acc ccg acg agc cgg cca tcg agt 265

Ala Pro Ser Leu Arg Leu Arg Cys Thr Pr Thr Ser Arg Pr Ser Ser

30

35

40

tca tgg gct gct gct gtg tct tgc gcg tgc aga ctg gtt gag cct gat 313
Ser Trp Ala Ala Ala Val Ser Ser Ala Ser Arg Leu Val Glu Pro Asp

45 50 55 60

ccg aat caa cct ctc atc aat ccg ctc aac ttg gtc ggt ccc gag atg 361
Pro Asn Gln Pro Leu Ile Asn Pro Leu Asn Leu Val Gly Pro Glu Met

65 70 75

tca aat ctt aca tcc aac atc cga tct ctc ctc ggt tca gga cac cct 409
Ser Asn Leu Thr Ser Asn Ile Arg Ser Leu Leu Gly Ser Gly His Pro

80 85 90

tct ctc gac act gtc gct aaa tac tat gtt cag tct gag gga aag cat 457
Ser Leu Asp Thr Val Ala Lys Tyr Tyr Val Gln Ser Glu Gly Lys His

95 100 105

att cgt ccg ctc atg gta ctg ctg atg gct cag gcg acg gag gtt gcg 505
Ile Arg Pro Leu Met Val Leu Leu Met Ala Gln Ala Thr Glu Val Ala

110 115 120

cca aaa gtt cag ggt tgg gag aag gtc gtg gag gtt ccg gtg aac gag 553
Pro Lys Val Gln Gly Trp Glu Lys Val Val Glu Val Pro Val Asn Glu

125 130 135 140

gga ctc gca cca cca gag gtg ctc aat gac aag aac cca gat atg atg 601
Gly Leu Ala Pro Pro Glu Val Leu Asn Asp Lys Asn Pro Asp Met Met

145 150 155

aac atg agg tca gga cca tta acg aag gac ggc gag atc gag gga cag 649

Asn Met Arg Ser Gly Pro Leu Thr Lys Asp Gly Glu Ile Glu Gly Gln

160

165

170

acg tcg aat atc ctc gcc tcg caa cgg cgg ttg gct gag atc acg gag 697

Thr Ser Asn Ile Leu Ala Ser Gln Arg Arg Leu Ala Glu Ile Thr Glu

175

180

185

atg atc cat gca gca tca ctc ctc cac gac gac gtt atc gac gct tcc 745

Met Ile His Ala Ala Ser Leu Leu His Asp Asp Val Ile Asp Ala Ser

190

195

200

gag acc aga cga aac gca cca tcc gga aac cag gca ttc gga aac aag 793

Glu Thr Arg Arg Asn Ala Pro Ser Gly Asn Gln Ala Phe Gly Asn Lys

205

210

215

220

atg gcg att ttg gct ggt gat ttc ttg ttg gga cgg gcg tct gtt gca 841

Met Ala Ile Leu Ala Gly Asp Phe Leu Leu Gly Arg Ala Ser Val Ala

225

230

235

ttg gcg agg ttg cgc aat ccg gag gtg att gag ctt ttg gct act gtt 889

Leu Ala Arg Leu Arg Asn Pro Glu Val Ile Glu Leu Leu Ala Thr Val

240

245

250

att gca aac ttg gtt gag gga gag ttc atg cag ttg aaa aat act gtt 937

Ile Ala Asn Leu Val Glu Gly Glu Phe Met Gln Leu Lys Asn Thr Val

255

260

265

gat gat gcg att gag gct acg gcg acg cag gaa acg ttc gat tac tat 985

Asp Asp Ala Ile Glu Ala Thr Ala Thr Gln Glu Thr Phe Asp Tyr Tyr

270	275	280	
ttg cag aag act tac ttg aag act gcg tcc ttg att gcc aag tgc tgc	1033		
Leu Gln Lys Thr Tyr Leu Lys Thr Ala Ser Leu Ile Ala Lys Ser Cys			
285	290	295	300
aga gca agt gcg ctt ctg ggt ggt gct acg cct gag gtt gct gat gct	1081		
Arg Ala Ser Ala Leu Leu Gly Gly Ala Thr Pro Glu Val Ala Asp Ala			
305	310	315	
gct tat gct tac gga agg aac ctt ggt ttg gca ttc cag atc gtc gac	1129		
Ala Tyr Ala Tyr Gly Arg Asn Leu Gly Leu Ala Phe Gln Ile Val Asp			
320	325	330	
gac atg ctc gac tac acc gtc tcc gct acc gac ctc ggt aag ccc gcc	1177		
Asp Met Leu Asp Tyr Thr Val Ser Ala Thr Asp Leu Gly Lys Pro Ala			
335	340	345	
ggt gca gac ctc cag ctc ggt ctc gcc acc gcg ccg gcc ctc ttc gca	1225		
Gly Ala Asp Leu Gln Leu Gly Leu Ala Thr Ala Pro Ala Leu Phe Ala			
350	355	360	
tgg aag cac cac gcc gag ctc ggt ccc atg atc aag cgc aag ttc tct	1273		
Trp Lys His His Ala Glu Leu Gly Pro Met Ile Lys Arg Lys Phe Ser			
365	370	375	380
gac cca gga gac gtc gag cgt gca cgc gag ttg gtc gag aaa agt gat	1321		
Asp Pro Gly Asp Val Glu Arg Ala Arg Glu Leu Val Glu Lys Ser Asp			
385	390	395	

gga ttg gag aag acg aga gcc ttg gcg gag gag tat gcc cag aag gcg 1369

Gly Leu Glu Lys Thr Arg Ala Leu Ala Glu Glu Tyr Ala Gln Lys Ala

400

405

410

ttg gat gca att cgg acg ttc ccg gag agt ccg gca cgg aag gct ttg 1417

Leu Asp Ala Ile Arg Thr Phe Pro Glu Ser Pro Ala Arg Lys Ala Leu

415

420

425

gag cag ttg acg gac aag gtg ttg act agg tca aga taggaattcgagct 1467

Glu Gln Leu Thr Asp Lys Val Leu Thr Arg Ser Arg

430

435

440

cggtacccgg ggatcctcta gagtcgacct gcaggcatgc aagcttggct gttttggcgg 1527

atgagagaag attttcagcc tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa 1587

acagaatttg cctggcggca gtagcgcggt ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga 1647

agtgaa

1653

<210> 2

<211> 440

<212> PRT

<213> Saioella complicata

<400> 2

Met Ala Ser Pro Ala Leu Arg Ile Arg Ser Ile Ser Ser Arg Ser

特平 1 1 — 2 3 7 5 6 1

1	5	10	15
Ile Ala Ser Leu Arg Ser Val Thr Leu Arg Thr Ala Ser Ala Pro			
20	25	30	
Ser Leu Arg Leu Arg Cys Thr Pro Thr Ser Arg Pro Ser Ser Ser			
35	40	45	
Trp Ala Ala Ala Val Ser Ser Ala Ser Arg Leu Val Glu Pro Asp			
50	55	60	
Pro Asn Gln Pro Leu Ile Asn Pro Leu Asn Leu Val Gly Pro Glu			
65	70	75	
Met Ser Asn Leu Thr Ser Asn Ile Arg Ser Leu Leu Gly Ser Gly			
80	85	90	
His Pro Ser Leu Asp Thr Val Ala Lys Tyr Tyr Val Gln Ser Glu			
95	100	105	
Gly Lys His Ile Arg Pro Leu Met Val Leu Leu Met Ala Gln Ala			
110	115	120	
Thr Glu Val Ala Pro Lys Val Gln Gly Trp Glu Lys Val Val Glu			
125	130	135	
Val Pro Val Asn Glu Gly Leu Ala Pro Pro Glu Val Leu Asn Asp			
140	145	150	
Lys Asn Pro Asp Met Met Asn Met Arg Ser Gly Pro Leu Thr Lys			
155	160	165	
Asp Gly Glu Ile Glu Gly Gln Thr Ser Asn Ile Leu Ala Ser Gln			
170	175	180	
Arg Arg Leu Ala Glu Ile Thr Glu Met Ile His Ala Ala Ser Leu			
185	190	195	
Leu His Asp Asp Val Ile Asp Ala Ser Glu Thr Arg Arg Asn Ala			
200	205	210	
Pr Ser Gly Asn Gln Ala Phe Gly Asn Lys Met Ala Ile Leu Ala			
215	220	225	

Gly Asp Phe Leu Leu Gly Arg Ala Ser Val Ala Leu Ala Arg Leu		
230	235	240
Arg Asn Pro Glu Val Ile Glu Leu Leu Ala Thr Val Ile Ala Asn		
245	250	255
Leu Val Glu Gly Glu Phe Met Gln Leu Lys Asn Thr Val Asp Asp		
260	265	270
Ala Ile Glu Ala Thr Ala Thr Gln Glu Thr Phe Asp Tyr Tyr Leu		
275	280	285
Gln Lys Thr Tyr Leu Lys Thr Ala Ser Leu Ile Ala Lys Ser Cys		
290	295	300
Arg Ala Ser Ala Leu Leu Gly Gly Ala Thr Pro Glu Val Ala Asp		
305	310	315
Ala Ala Tyr Ala Tyr Gly Arg Asn Leu Gly Leu Ala Phe Gln Ile		
320	325	330
Val Asp Asp Met Leu Asp Tyr Thr Val Ser Ala Thr Asp Leu Gly		
335	340	345
Lys Pro Ala Gly Ala Asp Leu Gln Leu Gly Leu Ala Thr Ala Pro		
350	355	360
Ala Leu Phe Ala Trp Lys His His Ala Glu Leu Gly Pro Met Ile		
365	370	375
Lys Arg Lys Phe Ser Asp Pro Gly Asp Val Glu Arg Ala Arg Glu		
380	385	390
Leu Val Glu Lys Ser Asp Gly Leu Glu Lys Thr Arg Ala Leu Ala		
395	400	405
Glu Glu Tyr Ala Gln Lys Ala Leu Asp Ala Ile Arg Thr Phe Pro		
410	415	420
Glu Ser Pr Ala Arg Lys Ala Leu Glu Gln Leu Thr Asp Lys Val		
425	430	435
Leu Thr Arg Ser Arg		

【図面の簡単な説明】

【図 1】

デカプレニル 2 磷酸合成酵素遺伝子を持つプラスミド、p N T S a 1 の制限酵素地図を示す。

【図 2】

デカプレニル 2 磷酸合成酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌 D H 5 α において、生産されたコエンザイム Q₁₀ を高速液体クロマトグラフィーによって検出したチャートを示す。

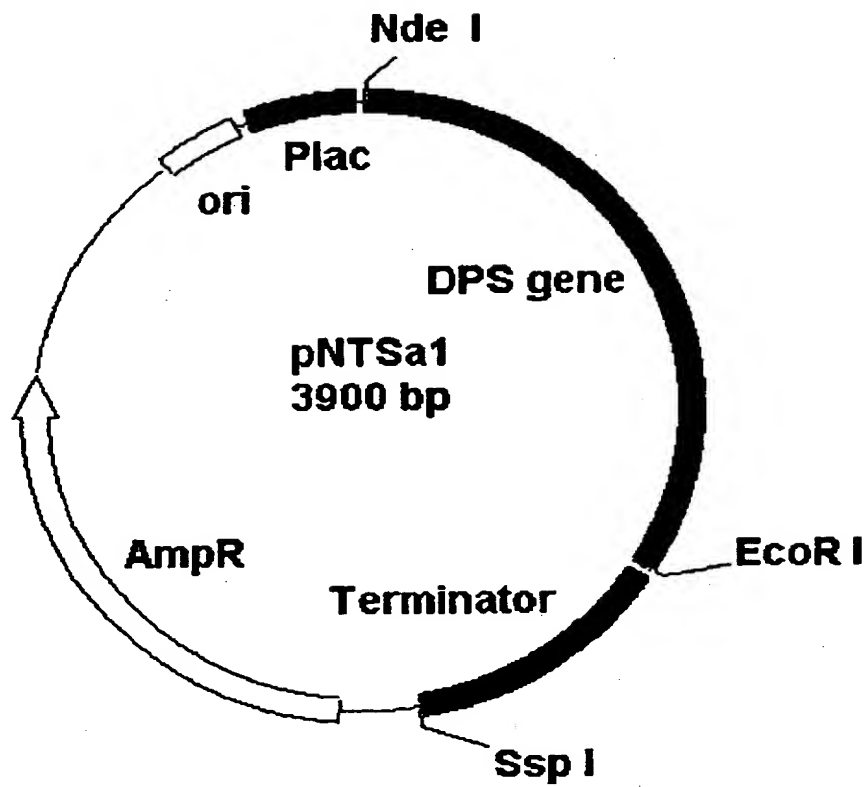
【図 3】

デカプレニル 2 磷酸合成酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌 K O 2 2 9 において、生産されたコエンザイム Q₁₀ を高速液体クロマトグラフィーによって検出したチャートを示す。

【書類名】

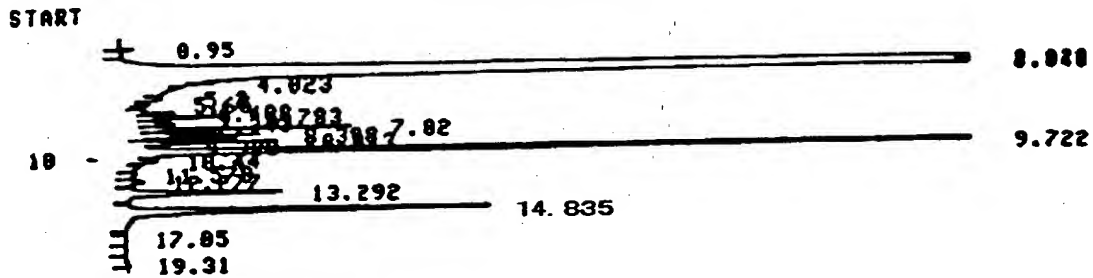
図面

【図 1】

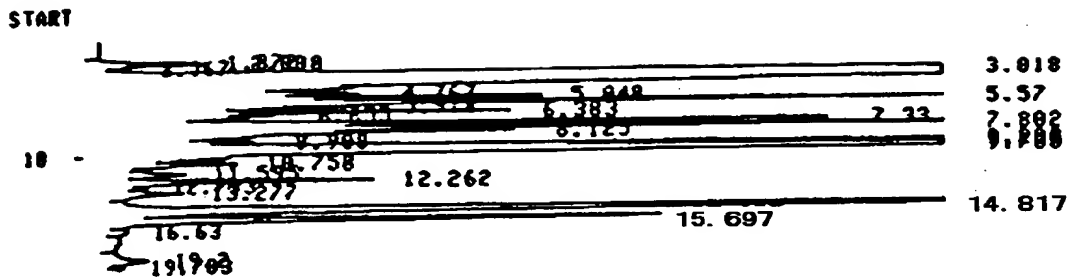


【図 2】

E.Coli DH5 α



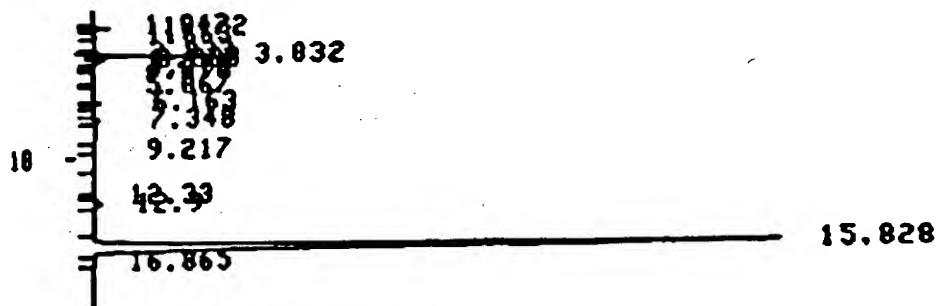
E.Coli DH5 α / pNTSa1



CoQ₁₀ Standard

SPEED(6)=2

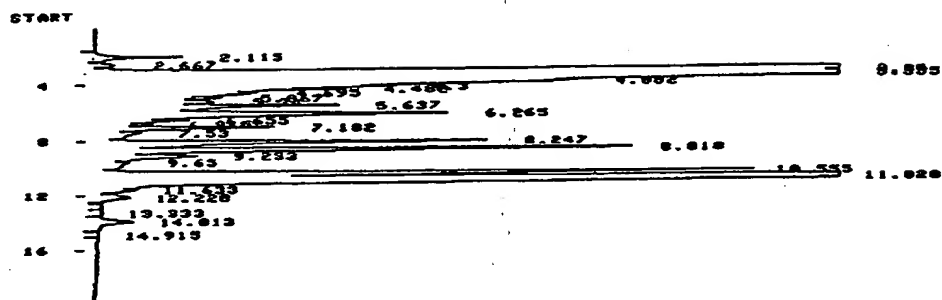
START



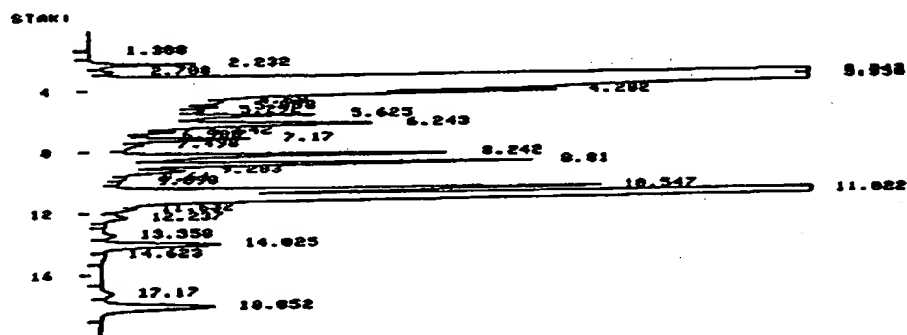
BEST AVAILABLE CO.

【図3】

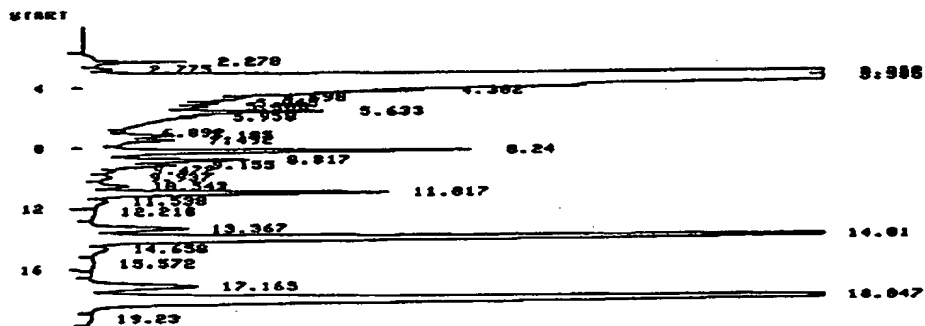
E.Coli KO229 / pKA3



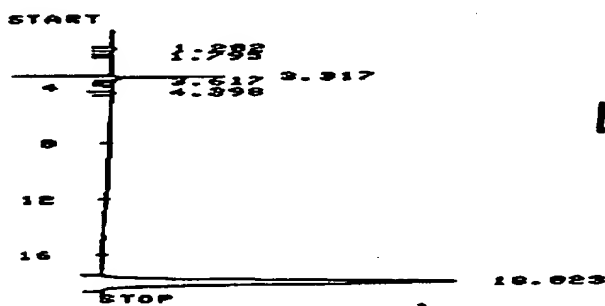
E.Coli KO229 / pKA3 + pNTSa1



E.Coli KO229 / pNTSa1



CoQ₁₀ Standard



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 *Saitoella* 属に属する真菌類由来のコエンザイム Q_{10} の側鎖合成遺伝子を利用することにより、微生物によってコエンザイム Q_{10} を効率よく生産する方法を提供する。

【解決手段】 配列番号1に記載のDNA配列、又はこの配列において1若しくは複数の塩基が欠失、追加、挿入、置換されたDNA配列を有し、デカプレニル2 磷酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【選択図】 なし

特平 11-237561

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第237561号
受付番号	59900817785
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成11年 8月27日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年 8月24日
-------	-------------

次頁無

特平 11-237561

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000941]

1. 変更年月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

氏 名 鐘淵化学工業株式会社